

氏 名 なかだ なおかつ
中田 直克

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 193 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学 位 論 文 題 目 Relationship between gene expression profile and malignancy
potential of GIST in different primary locations
(異なる原発部位における GIST の遺伝子発現プロファイルと悪性度
の関連性についての研究)

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	北村 寛
(副査)	教 授	井村 穰二
(副査)	教 授	村口 篤
(副査)	教 授	木村 友厚
(指導教員)	教 授	杉山 敏郎

Abstract

論文内容の要旨

Background

Gastrointestinal stromal tumor (GIST) is believed to originate from the interstitial cells of Cajal (ICC). Most GISTs show a gain-of-function mutation in the *c-kit* or *pdgfra* gene. Previous studies have shown that the risk of recurrence of GIST is different between the stomach and other locations; however, the underlying reason remains unclear. We hypothesized that gene expression profiles are different among cells at different primary locations when ICC express mutant *c-kit*.

Methods

We isolated ICC from the stomach and the cecum of tsSV40 large T antigen transgenic mouse and investigated each gene expression level of ICC with mutant KIT. The RNA expression profiles of the stomach ICC expressing mutant *c-kit* (ICC S^{V560D}) were compared with those of the cecum ICC expressing mutant *c-kit* (ICC C^{V560D}) using a gene expression array. Next, we analyzed the difference in gene expression between ICC with wild-type *c-kit* and mutant *c-kit* in the stomach (ICC S^{WT} and ICC S^{V560D}) and the cecum (ICC C^{WT} and ICC C^{V560D}).

Results

The gene expression of ICC with mutant *c-kit* was significantly different between the stomach and cecum. Interestingly, some growth factors, such as *Egr1* and *Scara5*, exhibited significantly different levels of gene expression between ICC C^{WT} and ICC C^{V560D}. In addition, these changes in gene expression were confirmed by the Western blot analysis and immunostaining of human surgical samples.

Conclusions

In this study, we proved that gene expression profiles differed significantly between ICC S^{V560D} and ICC C^{V560D}. Changes in protein levels of EGR1 and SCARA5 might be associated with GIST malignancy.

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【目的】

消化管間質腫瘍(gastrointestinal stromal tumors: GIST)は消化管に発生する間質系腫瘍のうち、最も発生頻度の高い腫瘍である。GIST はカハールの介在細胞 (ICC) に由来し、*c-kit*, *pdgfra* 遺伝子の機能獲得型変異が原因とされている。ほとんどの GIST は *c-kit* の exon 11 に変異があり、その他 exon 9 や *pdgfra* 遺伝子などに変異があるタイプもある。実際 exon 11 や exon 9 などに変異のあるノックインマウスには、GIST 様腫瘍が盲腸に発生するが、胃には過形成が認められるのみである。

一方臨床的には、胃原発 GIST と比較して胃以外原発の GIST は腫瘍が小さくても予後不良とされ、GIST の悪性度と原発部位との関連性が示唆されている。しかし、GIST の部位別発生機序や進展機序の違いに関しては、解明されていない。

そこで中田氏は、ICC に KIT が異常発現した後 GIST 形成に至る過程に、消化管部位別の相違があり、悪性度が異なっているとの仮説を立てた。本研究ではこの仮説を明らかにすることを目的とした。

【方法および成績】

1. 温度感受性 SV40T 抗原トランスジェニックマウスの胃および盲腸から ICC 細胞を分離し、cell line として ICC S および ICC C を樹立した。これらは細胞形態、mRNA および細胞表面マーカーのいずれにおいても ICC の性質を示していた。またこれらの細胞株は 33℃で培養すると増殖し、39℃で培養すると増殖しないことを確認した。
2. ICC S および ICC C に、野生型ヒト *c-kit* 遺伝子および遺伝子変異 (V-560D) 型ヒト *c-kit* 遺伝子を導入した。それぞれ ICC S^{WT}, ICC C^{WT}, ICC S^{V560D}, ICC C^{V560D} と命名した。ICC S および ICC C (*c-kit* 非導入細胞株) と異なり、各細胞株は 39℃で培養しても増殖した。
3. ICC S^{WT}, ICC C^{WT}, ICC S^{V560D}, および ICC C^{V560D} 間の遺伝子発現の違いを、GeneChip® Mouse Genome 430A 2.0 Array を用いて網羅的に解析した。各細胞株間で様々な遺伝子発現の違いが認められたが、これらのうち、転写因子である EGFR1 と細菌の受容体となる SCARA5 の二つに注目した。
4. Western blot 法で EGFR1 と SCARA5 の細胞株間の蛋白発現レベルの違いを検討した。EGFR1 に関しては、胃由来株でも盲腸由来株でも V560D *c-kit* 導入株では野生型 *c-kit* 導入株よりも高発現しており、ICC S^{V560D} では ICC C^{V560D} より高発現していた。SCARA5

に関しては、ICC S^{V560D} よりも ICC C^{V560D} おいて、より強く発現していた。

5. 臨床検体におけるEGR1およびSCARA5の発現を免疫染色で検証した。EGR1は胃GIST6例中6例で陽性（うち2例で強陽性）だったのに対し、小腸GISTでは5例中3例で陽性（強陽性例なし）であった。SCARA5は胃GISTと小腸GISTのいずれにおいても全例陽性であった。

【総括】

本研究では、ICC に変異型 *c-kit* 遺伝子を発現させて GIST を誘導すると、胃と盲腸で遺伝子プロファイルが異なることが明らかとなった。今回着目した EGR1 や SCARA5 に関しては、GIST の悪性度の違いを説明するタンパクの一部である可能性が示唆された。

以上の結果は GIST の発生部位別悪性度の違いを実験的に示した新規性があり、学術的重要性があると考えられる。今後は別の遺伝子の検証や多数例での臨床検体・データを解析することにより、新たな予後予測マーカーや治療標的を確立することが期待でき、臨床的発展性が見込まれる。

よって、本審査委員会は本研究を学術的ならびに臨床的観点から価値の高いものであると評価し、博士（医学）の学位に値するものと判定した。